

**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

TRABAJO FIN DE GRADO

**IMPLICACIÓN DE LAS
METALOPROTEINASAS EN EL
ENVEJECIMIENTO CARDIOVASCULAR**

Autor: Irene Escudero Alonso

Tutor: Sara Benedito Castellote

Convocatoria: Febrero 2017

ÍNDICE

1. RESUMEN	pág. 3
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	pág. 3
3. OBJETIVOS	pág. 5
4. METODOLOGÍA	pág. 5
5. RESULTADOS	pág. 6
5.1 Metaloproteinasas de matriz implicadas en el daño vascular durante el envejecimiento.	pág. 6
5.2 Biomoléculas reguladoras de la transcripción de MMPs	pág. 9
5.3 Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs)	pág. 13
5.4 MMPs y TIMPs como marcadores de riesgo	pág. 14
5.5 Terapias de futuro	pág. 17
6. DISCUSIÓN	pág. 18
7. CONCLUSIONES	pág. 19
8. BIBLIOGRAFÍA	pág. 20

1. Resumen

Los cambios dinámicos que se producen en la fisiología cardiovascular se encuentran regulados por diversos mecanismos extra e intracelulares. El incremento de la edad implica desequilibrios en la homeostasis molecular, que desemboca en una remodelación anómala de la pared cardiovascular, donde las proteínas efectoras son las metaloproteinasas (MMPs). En condiciones fisiológicas, estas enzimas se encargan del remodelado tisular en procesos como crecimiento óseo, cicatrización de heridas y reproducción, donde su actividad está regulada por los inhibidores tisulares específicos (TIMPs). Sin embargo, alteraciones en la síntesis de las biomoléculas implicadas en su transcripción de las MMPs, así como factores externos, conducen a un aumento de la actividad proteolítica sobre la matriz extracelular.

Los avances en la comprensión y conocimiento de las vías de señalización, así como la activación, regulación e inhibición de estas enzimas, en el sistema cardiovascular, pueden permitir un abordaje terapéutico previo al desarrollo de una patología cardiovascular, lo que proporciona una nueva vía de estrategias diagnósticas y terapéuticas para la remodelación de la pared cardiovascular y la progresión hacia la insuficiencia cardiovascular.

2. Introducción y antecedentes

El proceso de envejecer implica, de forma intrínseca, cambios estructurales y funcionales en la fisiología cardiovascular. También están involucrados factores genéticos, estilos de vida no saludables como dieta, actividad física, hábitos tóxicos, y enfermedades consideradas como factores de riesgo (diabetes, dislipemia, hipertensión y obesidad). Todos ellos son determinantes para que aparezcan y se desarrollen procesos patológicos cardiovasculares, caracterizados por una reducción de la distensibilidad arterial y un estrechamiento de la luz vascular.

La pared vascular es un órgano activo, flexible e integrado, con componentes celulares como las células endoteliales (CE), células del músculo liso vascular (CMLV) y fibroblastos, y con componentes no celulares como la matriz extracelular (MEC) que, de forma dinámica, se modifican o reorganizan en respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos. En el endotelio, el envejecimiento se asocia con el acortamiento de los telómeros, la apoptosis, los cambios estructurales y la disfunción de células endoteliales, como el incremento de la vasoconstricción dependiente del endotelio, la disminución en la biodisponibilidad del óxido nítrico y de la angiogénesis (1).

En el músculo liso vascular, el envejecimiento promueve el crecimiento celular, la hipertrofia vascular y el endurecimiento de la pared arterial asociado a la fractura de la elastina en la túnica media y el remodelado del colágeno tipo I; en consecuencia se incrementa la presión arterial y la presión de pulso con la edad (1). Las CMLV conforman la capa media y se encuentran interconectadas mediante la MEC, que supone un soporte estructural y funcional donde se produce la adhesión, proliferación, migración y diferenciación celular. La MEC está integrada por distintos componentes entre los que se encuentran, proteínas estructurales como colágeno, elastina, y proteoglicanos, proteínas de adhesión como la fibronectina y laminina, proteasas, y metaloproteinasas (MMPs). Los ancianos presentan una mayor cantidad de fibras de colágeno en la pared de las arterias, dichas fibras, presentan cruzamientos con otras proteínas de CMLV. Este proceso concluye con una mayor resistencia del colágeno a la degradación y recambio ordinario.

El remodelado aórtico relacionado con la edad, implica un perfil proinflamatorio de las células arteriales (CMLV y CE) y la matriz extracelular. Este perfil supone un aumento de la angiotensina II (2), de las moléculas de señalización de receptores de mineralocorticoides y la endotelina, de las metaloproteinasas, del factor de crecimiento transformante $\beta 1$ y del TNF- α , entre otros. Además, se incrementa la activación de TGF- β (3) y NADPH oxidasa en la pared arterial y disminuye la biodisponibilidad del óxido nítrico (Figura 1). El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) juega un papel crítico en la acumulación de MEC y en el remodelado vascular a través de la producción de varios agentes vasoactivos (4) como el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos. Las metaloproteinasas son las efectoras del daño sobre la matriz extracelular, donde cualquier

desequilibrio entre dichas proteasas y sus inhibidores tisulares (TIMPs) da como resultado una acumulación de colágeno y una remodelación matricial adversa. Se ha observado desorganización en la lámina elástica interna en ausencia de lesión vascular en relación con la edad, por aumento de la expresión de diversas MMPs con actividad elastasa, como MMP-2 y 9. Estímulos inflamatorios presentes en sujetos de edad avanzada, como TNF- α y TGF- β , están involucrados en una mayor activación de MMPs a escala vascular. Estos cambios moleculares observados durante el proceso de envejecimiento pueden representar nuevas dianas para la

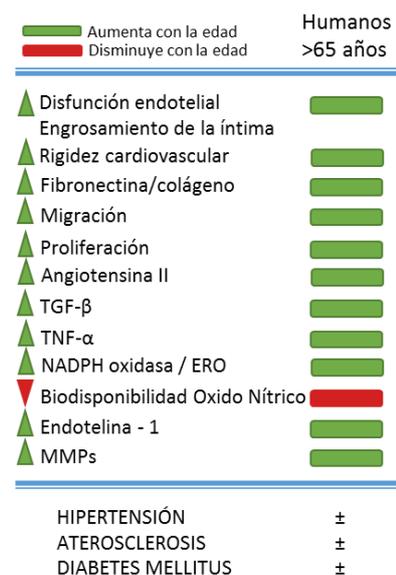


Figura 1. Cambios moleculares que se producen en el envejecimiento.

prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares relacionadas con la edad y están esquemáticamente representados en la figura 2 (5).

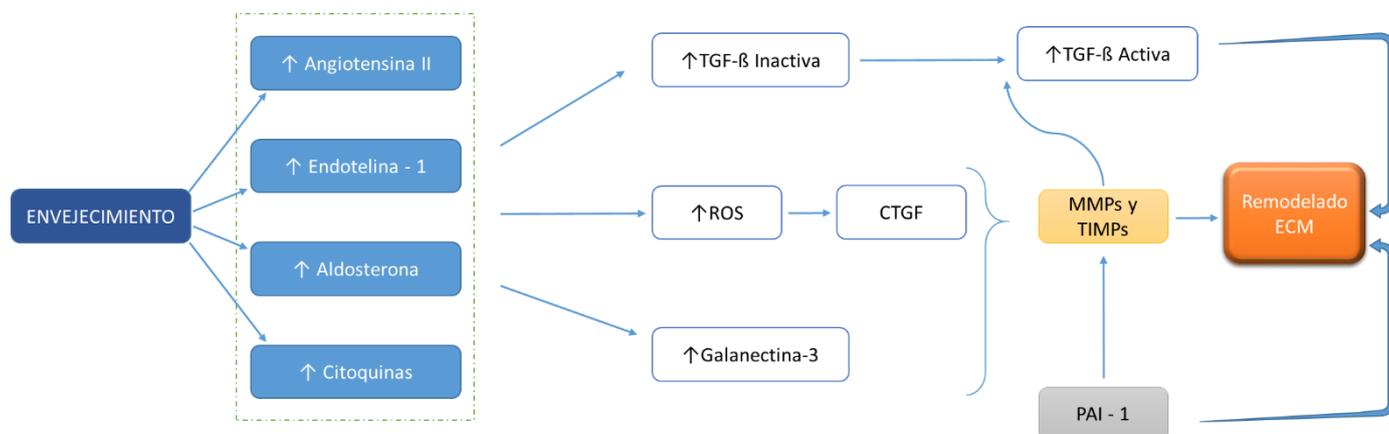


Figura 2. Esquema descriptivo de los factores desencadenantes del remodelado de la matriz extracelular.

3. Objetivos

- Determinar los mecanismos desencadenantes del daño cardiovascular durante el envejecimiento.
- Conocer la importancia de MMPs en el envejecimiento cardiovascular esclareciendo su activación e inhibición específica (TIMPs).
- MMPs y TIMPs como marcadores de riesgo.

4. Metodología

Se trata de una Revisión Bibliográfica. En su desarrollo se ha analizado información de revistas de divulgación científica, artículos científicos consultados a partir de distintas fuentes:

PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc>)

Med Line (<https://www.nlm.nih.gov/bsd/pmresources.html>)

Web of Science (<http://login.webofknowledge.com>)

Bucea (<http://biblioteca.ucm.es/>) Cisne (<http://cisne.sim.ucm.es/>)

Las publicaciones revisadas han sido escritas en inglés y en español, y se han priorizado aquellas más recientes.

Como método de introducción de referencias se ha utilizado Mendeley.

5. Resultados

5.1 Metaloproteinasas de matriz implicadas en el daño vascular durante el envejecimiento.

Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) son una familia de enzimas estructuralmente relacionadas, que desempeñan un papel importante en diversos procesos fisiológicos y patológicos. Están producidas por distintos tipos celulares como CE, CLMV, fibroblastos y monocitos, macrófagos y células T inflamatorias, inicialmente en forma de proenzima (zimógenos), y su actividad está regulada por inhibidores endógenos (TIMPs), que proporcionan un mecanismo de equilibrio para prevenir la degradación excesiva de la MEC. Un desequilibrio entre MMPs y TIMPs podría causar una elevada actividad de MMPs y puede conducir a cambios patológicos en la estructura de la pared vascular asociada con la enfermedad vascular.

MMP (tipo)	Denominación	Sustrato MEC	Sustrato no MEC
Colagenasas MMP-1	Colagenasa-1	Colágenos I, II, III, VII, VIII y X, gelatina, proteoglicanos, tenascina, entactina	α 1-AT, IL-1 β , pro-TNF, IGFBP-3, MMP-2, MMP-9
MMP-8	Colagenasa-2	Colágenos I, II, III, V, VIII y X, gelatina, agrecan	α 1-AT, α 2-AP, fibronectina
MMP-13	Colagenasa 3	Colágenos I, II, III, IV, IX, X y XIV, gelatina, tenascina, fibronectina, agrecan, osteonectina	MMP-9, PAI-2
Gelatinasas MMP-2	Gelatinasa A	Colágenos I, IV, V, VII, X, XI y XIV, gelatina, elastina, fibronectina, laminina, agrecan, versican, osteonectina, proteoglicanos	IL-1 β , α 1-PI, MMP-1, MMP-9, MMP-13
MMP-9	Gelatinasa B	Colágenos IV, V, VII, X, XIV, gelatina, elastina, agrecan, versican, proteoglicanos, osteonectina	α 1-AT, IL-1 β , plasminógeno
Estromalisinas MMP-3	Estromalisina-1	Colágenos III, IV, V y IX, gelatina, agrecan, versican, proteoglicanos, tenascina, fibronectina, laminina, osteonectina	α 1-AT, ATIII, ovostatina, IL-1 β , amiloide A, IGFB-3, fibrinógeno, plasminógeno, MMP-1, MMP-7, MMP-8, MMP-13
MMP-10	Estromalisina-2	Colágenos III, IV, V, gelatina, caseína, agrecan, elastina, proteoglicanos	MMP-1, MMP-8
MMP-11	Estromalisina-3	Caseína, laminina, fibronectina, gelatina, colágeno IV, transferrina	α 1-AT, caseína, IGFB-1
Tipo membrana MMP-14	MT1-MMP	Colágenos I, II y III, caseína, elastina, fibronectina, vitronectina, tenascina, proteoglicanos, laminina, entactina	α 1-AT, MMP-2, MMP-13
MMP-15	MT2-MMP	Tenascina, fibronectina, laminina	MMP-2
MMP-16	MT3-MMP	Colágeno III, gelatina, caseína, fibronectina	MMP-2
MMP-17	MT4-MMP	ND	MMP-2
MMP-24	MT5-MMP	ND	MMP-2
MMP-25	MT6-MMP	ND	MMP-2
Otras MMP-7	Matrilisina	Colágenos IV y X, gelatina, agrecan, proteoglicanos, fibronectina, laminina, entactina, tenascina, caseína transferrina, integrina b ₃ , osteonectina, elastina	MMP-1, MMP-2, MMP-9, plasminógeno, α 1-AT
MMP-12	Metaloclastasa	Colágeno IV, gelatina, elastina, caseína, laminina, proteoglicanos, fibronectina, vitronectina, entactina	α 1-AT, fibrinógeno y fibrina, plasminógeno, mielina
MMP-20	Enamelisina	Amelogenina	ND
MMP-23A	MMP-21	ND	ND
MMP-23B	MMP-22	ND	ND
MMP-26	Matrilisina 2	Colágeno IV, fibrinógeno, fibronectina, caseína	MMP-9
MMP-27	ND	ND	ND
MMP-28	Epilisina	Caseína	ND

Tabla 1. Características y especificidad de las principales metaloproteinasas. Art: J.A. Páramo. Metaloproteinasas en aterosclerosis: implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas.

Se han identificado 25 subtipos de metaloproteinasas, con una homología entre ellas del 30 al 50%, y se clasifican en diferentes subgrupos en función de su estructura, especificidad por el sustrato y unión a membranas. (Tabla 1)

Debido a la gran cantidad de sustratos específicos como no específicos, las metaloproteinasas participan en numerosas funciones fisiológicas como embriogénesis, remodelado tisular, angiogénesis, proliferación, migración, diferenciación y apoptosis celular, así como procesos patológicos implicados en la formación de la placa de ateroma, artritis, cáncer y fibrosis (6).

Aunque la función más estudiada de las MMPs ha sido la degradación de los componentes de la MEC, recientemente se ha demostrado que, además, cumplen con un papel importante en el procesamiento de moléculas como factores de crecimiento, moléculas de adhesión, así como receptores de membrana.

5.1.1 Estructura

Las MMPs son enzimas ligadas a metal cuya actividad proteasa es dependiente del zinc, y requieren calcio para llevar a cabo su acción biológica y mantener su estabilidad.

Todos los miembros de la familia MMPs comparten una estructura muy similar (Figura 3). Se sintetizan como proenzimas (pro-MMPs) y su estructura tridimensional consiste en un péptido señal, que permite el paso de la proteína desde la célula al espacio extracelular, seguido por un dominio propéptido, rico en residuos de cisteína, que se utiliza para proteger el dominio catalítico y evitar la activación de MMPs. El centro activo posee un átomo de Zn^{2+} coordinado con tres residuos de histidina, es el lugar donde se produce la degradación de sustratos como colágeno o elastina. En las proenzimas, el átomo de Zn^{2+} está unido a un residuo de cisteína, impidiendo la interacción de una molécula de agua con el catión, lo que permite que la enzima se mantenga en estado de latencia. La hidrólisis de la unión zinc-cisteína libera el propéptido y abre el centro catalítico en la molécula y procede a la activación de MMPs (6).

En el caso de MMP-2 y MMP-9 (gelatinasas), además presentan tres residuos de fibronectina en el sitio catalítico. Finalmente, existe un dominio tipo hemopexina separado del dominio catalítico por una región bisagra, que puede estar unido también a un enlazador transmembrana para miembros de MMPs que tienen una localización sobre la superficie celular. Se ha demostrado que el procesamiento trans-Golgi y las etapas de activación intracelular, juegan un papel crítico en el procesamiento de la MT1-MMP madura. De este modo, a diferencia de las MMPs secretables, las MT-MMP se insertan en la membrana celular ya activadas y por lo tanto pueden servir como punto pericelular de la actividad proteolítica de la

MEC (7).

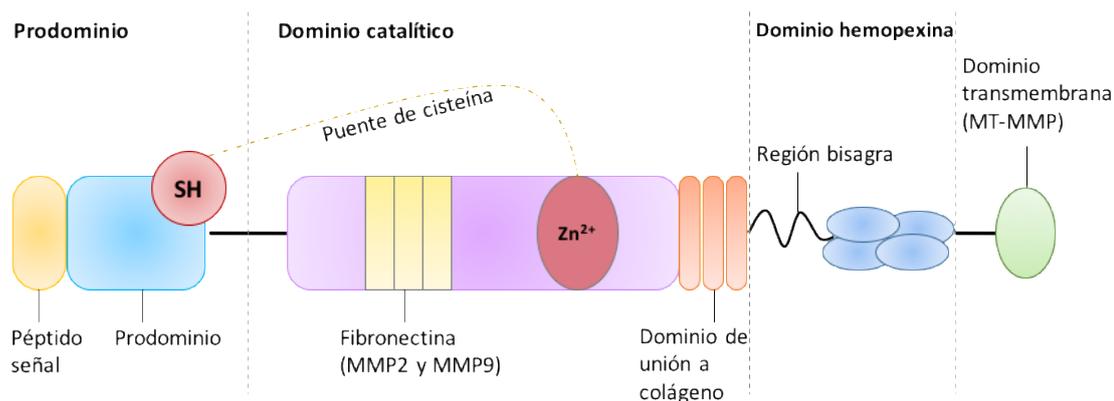


Figura 3. Estructura representativa de una metaloproteína. Cuatro dominios principales: Prodominio, dominio catalítico, dominio tipo hemopexina y dominio transmembrana.

5.1.2 Regulación

La actividad de las MMPs está regulada intra y extracelularmente en 3 ámbitos, transcripcional, postraducciona, a través de interacción con inhibidores específicos y por su localización intra/extracelular (8).

En condiciones fisiológicas normales, las actividades de las MMPs se regulan a nivel de transcripción, activación de los zimógenos precursores, e interacción con componentes MEC específicos (9). Para la inducción de la activación de una pro-MMP, el prodominio debe encontrarse deslocalizado con respecto al sitio catalítico, para ello, están implicados diversos mecanismos.

In vitro la escisión del enlace de cisteína se puede producir por el empleo de agentes S-reativos o agentes químicos como organomercuriales, detergente SDS y agentes caotrópicos.

In vivo, la activación implica la proteólisis del prodominio, o bien la ruptura del puente de cisteína o el desprendimiento del dominio hemopexina, conducido por proteasas como tripsina, elastasa, serinproteasas u otras MMPs.

Se han descrito otros mecanismos de activación de pro-MMPs, mediante interacción con dominios específicos, que permiten que los zimógenos puedan ser presentados a su molécula activadora a través de la interacción con glucosaminoglicanos u otras moléculas de superficie. También mediante interacción alostérica con el sustrato específico, o a través de la reacción con sustratos fisiológicos como peroxinitrito y glutatión, que degradan las enzimas que conforman el prodominio y oxidan mediante S-glutationilación el enlace zinc-cisteína, respectivamente (10).

Después de que se produzcan estímulos biológicos y /o mecánicos extracelulares, se suceden cascadas de señalización intracelulares con un efecto positivo/negativo en la síntesis de pro-MMPs. Las señales de citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), las interleucinas y otros inductores extracelulares de MMPs son muy eficaces para regular la producción de proenzimas en células de músculo liso, miocitos o fibroblastos y transportarlas a la matriz extracelular. Otros factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento derivado de plaquetas y ligandos de CD40, también pueden controlar eficazmente los mecanismos de transcripción de miembros de la familia de MMPs (11). Existen varios elementos principales de unión al DNA que actúan en la mayoría de los promotores de MMPs, la proteína activadora 1 (AP-1), el potenciador del poliovirus A (PEA-3), el factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de las células B (NF-kB) y el SP-1. Por lo tanto, los sitios de unión de los distintos factores transcripcionales, el número de sitios de unión al DNA y el tipo de estímulos determinarán la actividad transcripcional de las MMPs. Es este nivel de regulación transcripcional el que proporciona especificidad regional a la inducción de MMPs dentro del miocardio.

5.2 Biomoléculas reguladoras de la transcripción de MMPs

Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA)

El Sistema Renina Angiotensina (SRAA) (2), caracterizado por sus hormonas circulantes, la **angiotensina II** (Ang II) y la aldosterona, presenta un papel clave en la regulación de la presión arterial y el balance hidroelectrolítico. También participa en procesos de crecimiento celular / apoptosis de las células vasculares, migración de CMLV, respuestas inflamatorias y remodelación estructural de MEC (2). Además, durante el envejecimiento, se producen disfunciones en dicho sistema que se traducen en un aumento de la secreción de Ang II y aldosterona, permitiendo el desarrollo de diversas patologías cardiovasculares.

La Ang II es la principal hormona efectora de SRAA y permite la adhesión de monocitos, leucocitos y neutrófilos a CE y CMLV. En CMLV se encuentran dos receptores específicos de la angiotensina, AT1 y AT2. AT1 es un receptor que interviene en la regulación de la presión arterial, procesos de crecimiento celular e induce la producción de proteínas en MEC. A su vez, su inducción, permite la activación de factores transcripcionales y el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO).

Se ha demostrado que la **aldosterona** aumenta la densidad cardíaca y la expresión génica de estos receptores AT1. Además, una mayor expresión de enzima convertidora de angiotensina (ECA) y TGF- β se puede encontrar en las ratas que han sido tratadas con aldosterona. También se ha demostrado que la aldosterona estimula la expresión del inhibidor del plasminógeno (PAI-1), CTGF y TGF- β , a través de la cascadas de señalización p38 MAPK, MEK/ERK, PKC (12), permitiendo la transcripción de metaloproteinasas de matriz que desencadenan una alteración de la íntima, bloqueándose la degradación de MEC, y como consecuencia, favoreciendo la fibrosis vascular.

Endotelina-1

Las endotelinas son unos péptidos paracrinos, diferenciados en 4 isoformas (ET-1, ET-2, ET-3 y ET-4). La **Endotelina-1** (ET-1) es la predominante y su acción principal es producir una potente vasoconstricción. La biosíntesis de ET-1 se estimula en el envejecimiento, y también en presencia de factores de riesgo cardiovascular, de obesidad, de cambios en pH, por ejercicio físico (hipoxia), lo que indica que su función está relacionada con el mantenimiento de la actividad cardíaca.

Es secretada por el endotelio, hacia las CMLV principalmente, pero también se produce en otras células como leucocitos y macrófagos (12). La acción paracrina, la realiza mediante la unión a sus receptores específicos, ETA y ETB, que se encuentran en células endoteliales (CE) y macrófagos. La activación de ETA provoca, además de una vasoconstricción duradera, un estímulo el crecimiento celular y procesos como fibrosis y trombosis.

Se han descrito niveles elevados de ET-1 en aterosclerosis, infarto de miocardio, hipertensión arterial y fallo cardíaco. Se considera, que niveles altos de ET-1 de forma crónica suponen un riesgo cardiovascular, ya que producen fibrosis vascular, miocárdica e hipertrofia miocárdica. También ejerce un efecto sobre factores TGF- β , y activa la producción de ERO y MAPK, que desencadenan la transcripción de MMPs. A su vez se ha comprobado que TGF- β puede inducir la expresión de ET-1 en CE a través de las proteínas SMAD(11).

TGF – β /Smad

TGF- β es un factor de crecimiento transformante beta, integrado en una superfamilia de proteínas que regulan la división celular, migración, adhesión y apoptosis celular. Además promueven la producción de proteínas que integran la MEC y favorecen la embriogénesis. TGF-

$\beta 1$ es la isoforma más importante, ya que aumenta su proporción en el envejecimiento, y está presente en multitud de células como CE, macrófagos y distintas células hematopoyéticas (11).

Su biosíntesis se realiza mediante la unión de la proteína inactiva o latente LTGF- β a la MEC, de forma específica, desencadenando la cascada de señalización que finaliza con una regulación transcripcional de distintos factores implicados en daño vascular, como las MMPs. La ET-1, Ang II y las MMPs, por retroalimentación, estimulan y regulan la síntesis y activación de TGF- β (4).

Es un factor esencial que contribuye a la modulación metabólica de la expresión de los genes MEC. La activación de TGF- $\beta 1$ vascular, aumenta la síntesis proteica en la matriz extracelular, como fibronectina, colágeno, inhibidores de metaloproteinasas (TIMPs) y PAI-1, que es un inhibidor de proteasas importante en la remodelación del tejido. A su vez, TGF- β , estimula la expresión de metaloproteinasas (MMPs), encargadas de la degradación de proteínas de la matriz (gelatina y elastina), generando un desequilibrio funcional en la pared vascular (4).

En la cascada de señalización TGF- β /Smad destacan los receptores Smad 2, Smad 3 y Smad 4. Smad 2, se asocia de forma heterotrimérica con Smad 3 y Smad 4 para translocarse al núcleo, y una vez dentro, no se une directamente al DNA, sino que requiere de TIE, una proteína nuclear específica, para activar la respuesta transcripcional de TGF- β (3) y posterior desarrollo de tejido fibroso.

Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF)

CTGF es una proteína secretable, rica en cisteínas, que regula procesos de proliferación/apoptosis celular, angiogénesis, migración, adhesión y fibrosis vascular.

Según el tipo celular, una gran variedad de factores y moléculas están implicadas en la regulación de la expresión de CTGF. Factores de crecimiento como TGF- β , la angiotensina II, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), la interleucina-4 (IL-4), las altas concentraciones de glucosa, la hipoxia, el estrés mecánico y el estrés oxidativo aumentan rápidamente la expresión de CTGF.

El avance de la edad provoca un aumento de CTGF, que desencadena diversos mecanismos de señalización profibróticos, entre ellos, se encuentran la vía de señalización de las proteínas Smad, las especies reactivas de oxígeno (ROS), la proteína quinasa C (PKC), la quinasa Janus (JAK), y las cascadas de quinasas activadas por mitógenos (MAPK).

Se ha descrito que el CTGF se une directamente al TGF- β . Esta unión lleva a una potenciación de la actividad del TGF- β . El mecanismo se basa en una función de chaperona del

CTGF que incrementa la afinidad del TGF- β por sus diferentes receptores, por lo que sus respuestas son más intensas y prolongadas. Esta no es la única forma por la que el CTGF ayuda a las respuestas del TGF- β . La producción endógena de CTGF por el TGF- β lleva a una supresión transcripcional del Smad-7 a través de la inducción del factor de transcripción del gen de respuesta temprana inducible por TGF- β (TIEG-1). Mediante este mecanismo, el TGF- β bloquea la regulación por retroalimentación a través del Smad-7, perpetuando la activación de la señalización del TGF- β . Por tanto, hay numerosas evidencias que implican a CTGF y a TGF- β como factores que actúan de manera sinérgica para promover fibrosis crónica (11).

Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son derivados reactivos del metabolismo de O₂ que se encuentran en todos los sistemas biológicos. Con el envejecimiento, se ven aumentados los niveles de estrés oxidativo, ya que disminuye la actividad de la superóxido dismutasa encargada de la transformación de los radicales, y por consiguiente la proporción de ERO se eleva. Recientemente se ha reconocido que las **ERO** actúan como importantes mensajeros intracelulares e intercelulares que modulan distintas cascadas de señalización, como las tirosin quinasas, los factores de transcripción, las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y los canales iónicos. La estimulación de estas cascadas de señalización activa el crecimiento y migración de células de músculo liso vascular (CMLV), expresión de mediadores proinflamatorios y modificación de la matriz extracelular (MEC). Además, las ERO aumentan las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ libre, provocando una movilización del Ca²⁺ reticular y desencadenando la activación de los canales de calcio en CMLV y CE, generando una activación de citoquinas que pueden alterar la contractilidad vascular (13).

En condiciones fisiológicas, estos eventos están altamente regulados y juegan un papel importante en el mantenimiento de la función vascular y la integridad de la misma. Bajo condiciones patológicas, cualquier desequilibrio de ERO, por una mayor producción y / o un potencial antioxidante reducido, se contribuye al aumento de la biodisponibilidad de los radicales libres y consecuentemente al estrés oxidativo, lo que da lugar a disfunción vascular y remodelación a través de daño oxidativo (12).

Citoquinas

Las citoquinas como el **factor de necrosis tumoral (TNF- α)** y la **interleucina IL-1 β** son moléculas proinflamatorias, implicadas en el proceso de remodelado miocárdico. Estudios

recientes han demostrado que los niveles circulantes de estas biomoléculas se encuentran elevados en los ancianos (14). La cascada de señalización del TNF- α puede estimular a múltiples vías, una de las cuales desencadena la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (JNK y p38) y la formación de los complejos de transcripción de la familia AP-1 y NF- κ B. Por lo tanto, se deduce que el TNF- α modifica la transcripción de MMPs y finalmente los niveles de MMPs miocárdicos. A su vez, el TNF- α aumenta la expresión de especies reactivas de oxígeno que contribuyen a la disfunción endotelial. La citoquina proinflamatoria IL-1 β , a través de su receptor, también puede ocasionar la activación de los factores NF- κ B y AP-1 aumentando su afinidad por el DNA. Estudios *in vitro* en fibroblastos miocárdicos expuestos a TNF- α y IL-1 β , han demostrado que ambas citoquinas pueden estimular la producción de ciertos tipos de MMPs, como MMP-2 y MMP-9 (15).

4.3 Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs)

Los **inhibidores específicos de metaloproteinasas** (TIMPs) son los principales inhibidores endógenos de las MMPs, exhibiendo eficacias variables frente a diferentes MMPs, así como diferentes patrones de expresión tisular y modos de regulación. Por consiguiente, son importantes reguladores de la remodelación de MEC, protegiéndola de la degradación en tejidos sanos. Durante el envejecimiento, la proporción de estos inhibidores se encuentra disminuida, contribuyendo así a la patogénesis vascular.

En los humanos, el genoma codifica para cuatro inhibidores, desde TIMP1 a TIMP4 (16). Se unen a las MMPs de manera no covalente en complejos estequiométricos (1:1), formando un complejo reversible y de alta afinidad con dichas enzimas. En general todos son capaces de inhibir a todas las metaloproteinasas, aunque existe cierta especificidad, por ejemplo TIMP1 tiene un mayor espectro de inhibición y posee afinidad por MMP9, pero falla al inhibir MT-MMP1 y TIMP2 se une específicamente a MMP2. Del mismo modo TIMP3, inhibe a distintas adamalisinias y se ha relacionado con una remodelación matricial adversa previa a una insuficiencia cardíaca (17). TIMP4 posee un efecto protector frente las potenciales acciones perjudiciales de la MMP2, ya que a nivel intracelular se encuentra localizado en el sarcómero de los cardiomiocitos (8). Los TIMPs (21 a 29 kDa) tienen un dominio N-terminal de aproximadamente 125 aminoácidos y un dominio C-terminal con aproximadamente 65 residuos, cada uno con tres enlaces disulfuro

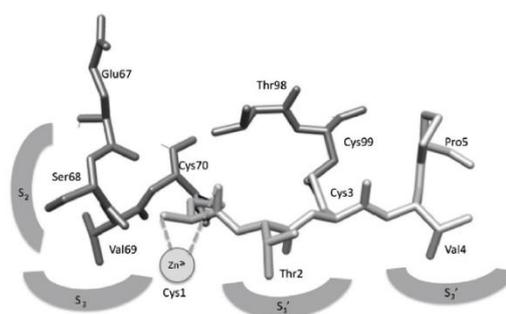


Figura 4. Mecanismo de interacción entre TIMPs y MMPs.

conservados. El dominio N-terminal se pliega como una unidad separada y es capaz de inhibir MMPs, de forma independiente. El mecanismo de inhibición se basa en la inserción de N-TIMP en el sitio activo de metaloproteinasa de tal manera que el residuo de cisteína (Cys1) N-terminal se solapa por encima del Zn^{2+} catalítico de la MMP (Figura 4). Una clave del mecanismo de inhibición es la coordinación del ion metálico por el grupo α -amino N-terminal y el grupo carbonilo de Cys1, que desplaza de la enzima la molécula de agua necesaria para la hidrólisis del enlace peptídico, y por tanto impide la activación de las MMPs. Pero el grupo tiol del residuo de cisteína es susceptible de oxidarse, lo que provoca la inactivación de la capacidad inhibitoria de TIMP, traducándose en un aumento de la actividad de MMPs. Por otra parte, las interacciones entre los inhibidores y las pro-MMPs se estabilizan mediante la unión del C-terminal de TIMP y el dominio hemopexina de los zimógenos, dejando libre el extremo N-terminal, permitiéndole actuar como inhibidor de otras MMPs (16).

También se sabe que pueden actuar sobre distintas vías de señalización que están implicadas en la regulación del crecimiento y apoptosis, y son usados como marcadores de la evolución del cáncer y de enfermedades cardiovasculares.

5.4 MMPs y TIMPs como marcadores de riesgo

El envejecimiento es un importante factor de riesgo de mortalidad y morbilidad cardíaca. Los pacientes ancianos con enfermedad cardiovascular aguda tienen malos resultados clínicos. El envejecimiento se asocia con alteraciones en los mecanismos homeostáticos que hacen que la red vascular sea más susceptible a los efectos perjudiciales de las condiciones fisiopatológicas. Para la cuantificación del recambio patológico de la MEC en tejidos cardiovasculares, es necesario conocer los biomarcadores específicos que esclarezcan una evidencia clínica de envejecimiento cardiovascular, y por tanto, útiles para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento terapéutico (18).

El biomarcador circulante más prometedor de degradación de la MEC asociada a la edad es la MMP-9, que en particular, degrada un amplio espectro de sustratos de matriz, citoquinas y factores de crecimiento (19). Se ha demostrado que el aumento de MMP-9 predice el estrechamiento de la luz arterial, la reestenosis postendoprótesis y la muerte cardiovascular en pacientes con enfermedad coronaria; también contribuye a la expansión y la rotura de aneurismas aórticos, e incrementa el riesgo de transformación hemorrágica en pacientes con ictus. Estos biomarcadores también pueden ofrecer información pronóstica en el ámbito de la prevención primaria. Así, MMP-9 predice cardiopatía isquémica y/o hipertensión arterial en sujetos sin enfermedad cardiovascular previa (18).

Los estudios analizados tienen como objetivo establecer una relación causal entre la progresión con la edad y la elevación de los niveles plasmáticos de MMP-9. Yabluchanskiy y col. (21) examinaron a ratones antes de que desarrollaran una disfunción diastólica, es decir ratones de 15 a 18 meses de edad, para identificar mecanismos tempranos que llevaran al envejecimiento cardíaco. Debido al papel crítico de la MMP-9 en el remodelado del ventrículo izquierdo (VI) y las respuestas inflamatorias al envejecimiento y al infarto de miocardio, una mejor comprensión de los cambios dependientes de MMP-9 que ocurren en el VI durante la edad madura debería ayudar a identificar objetivos terapéuticos potenciales para preservar la función vascular. Se compararon los ratones de 15-18 meses de edad con ratones jóvenes de 6 a 9 meses de edad que pertenecían a un subgrupo previo, seleccionado al azar. Se tomaron muestras de sangre de la arteria carótida, y se realizaron estudios histológicos sobre el ventrículo izquierdo, analizando el número de miocitos, así como el espacio entre miocitos, y se cuantificó el depósito de colágeno sobre las secciones del ventrículo y los niveles de metaloproteinasas.

Los resultados obtenidos demostraron un doble aumento en la expresión del gen MMP-9 en ratones adultos en comparación con ratones jóvenes (Figura 5). Los niveles de la enzima MMP-9 también aumentan con la edad en el ventrículo izquierdo debido al aumento de la infiltración de macrófagos. Por otra parte, se observó un aumento de la hipertrofia en los miocitos. En cuanto al depósito de colágeno no se destacó ninguna diferencia entre los grupos, lo que indica que la fibrosis cardíaca se desarrolla en etapas más tardías.

El aumento asociado con la edad en la MMP-9 contribuye al aumento de la señalización proangiogénica en un intento de estimular la formación de nuevos vasos como consecuencia de la hipertrofia en los miocitos. La delección de MMP-9 disminuye la angiogénesis, atenúa la inflamación y previene la filtración vascular, de citoquinas proinflamatorias, en el contexto del envejecimiento cardíaco (19).

Por el contrario, otros estudios han demostrado que no existe relación directa entre el envejecimiento y las metaloproteinasas de matriz, dado que coexisten con otros factores de riesgo cardiovascular (20). Pero si tienen relación con el progreso de enfermedades cardíacas y

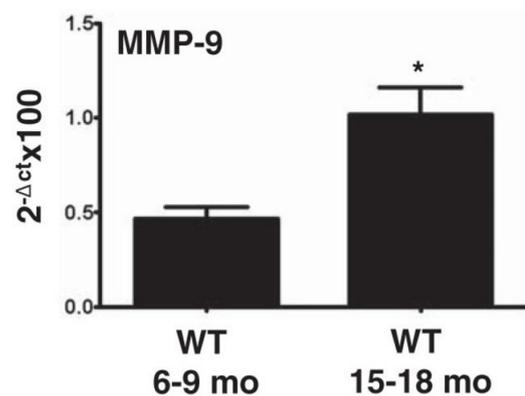


Figura 5. Comparativa de niveles plasmáticos de MMP-9 en ratones adultos en relación con ratones jóvenes.

pueden suponer marcadores en el curso de complicaciones o como valor predictivo en la aparición de daño cardíaco primario (21) (22).

Otros estudios han relacionado los cambios en la estructura y composición de la matriz extracelular cardíaca producidos por un incremento de MMP-9 asociado al envejecimiento, se produjo una disminución en el colágeno tipo III, EMILIN-1 (glicoproteína de matriz extracelular) , fibronectina, y proteínas del citoesqueleto implicadas en la adhesión y comunicación celular en MEC (catenina y sorbina)(23) (Figura 6). Los recuentos celulares indicaban un cambio en las proteínas de la matriz en aquellos ratones adultos a los que no se les había delecionado MMP-9. Mientras que los ratones adultos con la MMP-9 eliminada, la proporción proteica se mantuvo.

Puesto que los niveles de MMP-9 cardíaca aumentan con la edad, estos datos sugieren que la actividad de MMP-9 puede ser responsable de la disminución observada en los niveles de EMILIN-1. Por otra parte, una reducción de la expresión EMILIN-1 conducirá a un aumento directo de TGF β , que a su vez puede explicar el perfil pro-inflamatorio arterial asociado a la edad (23).

En otro estudio con pacientes con insuficiencia cardíaca secundaria (15), se han observado aumentos en los niveles plasmáticos de productos de degradación del colágeno. Los niveles plasmáticos de MMP-8 y MMP-9 se correlacionaron con los cambios en los niveles de receptores de TNF- α , ambas metaloproteinasas pueden ser sintetizadas por células inflamatorias e inducidas por citoquinas tales como TNF- α . En conjunto, la aparición de estos tipos de MMPs en el plasma de pacientes con enfermedad cardíaca, sugiere que la inflamación puede ser un factor contribuyente.

No sólo los niveles plasmáticos de metaloproteinasas pueden ser biomarcadores de remodelación adversa de la matriz vascular. Cambios en los niveles plasmáticos de TIMP-1, se asociaron con los principales factores de riesgo cardiovascular y con la presencia de hipertrofia en el ventrículo izquierdo (24). Además, los cambios en los niveles plasmáticos de TIMP-1 se han asociado con un aumento de la mortalidad (25). Sin embargo, los cambios en los niveles plasmáticos de MMPs y TIMPs observados en estos estudios, son debidos a una enfermedad

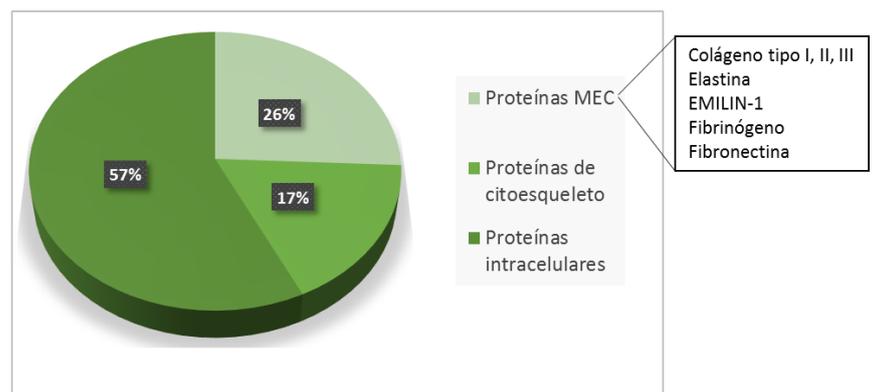


Figura 6. Cambios en las proporciones proteicas de la MEC en relación al envejecimiento.

cardiovascular ya desarrollada, pero proporcionan evidencias para apoyar la utilidad potencial de los perfiles plasmáticos de MMPs y TIMPs en términos de pronóstico.

5.5 Terapias de futuro

Es importante elucidar las vías específicas que regulan los elementos transcripcionales que inducen la síntesis MMPs / TIMPs para la investigación básica futura. Los mecanismos de actuación son los siguientes:

- Interceptar la transcripción para bloquear su síntesis. Esto se consigue de tres maneras distintas: bloqueando la acción de factores extracelulares (la propia molécula o su receptor), bloqueando las rutas de transmisión de señales (vías de MAPK, p38MAPK, Ras o TGF- β), y bloqueando los factores de transcripción que controlan los promotores de las MMPs (AP-1 y NF-kB). Las terapias también pueden ser orientadas hacia el silenciamiento de mRNAs, u orientación de transcripciones específicas que impidan o favorezcan la síntesis de MMPs/TIMPs concretos.

- Impedir la activación de las proMMPs. Existen algunas MMPs que participan en la activación de otras MMPs, como es el caso de MT1-MMP: al bloquear la MT1-MMP se evita la activación de la cascada proteolítica. Existen, además, inhibidores directos de las MMPs, como la trombospondina-1, que se une a la proMMP2 y la proMMP9 con lo que se impide su activación. En este grupo se incluyen también las endostatinas y angiostatinas.

- Inhibir la acción de las MMPs activas. Pueden emplearse varios métodos como el uso de TIMPs, aunque aparecen problemas debido a que estas moléculas presentan otras funciones aparte de la inhibición de las MMPs y, además, suelen tener un amplio espectro de acción, o como el uso de inhibidores sintéticos de MMPs (MMPI).

6. Discusión

El envejecimiento asociado con trastornos moleculares es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. A medida que aumenta la esperanza de vida, se necesita un enfoque específico de los sistemas biológicos para asegurar que tengamos una vida sana. No se debe desestimar que la edad, la enfermedad, el estilo de vida, la genética y los factores ambientales están entrelazados y que hay interacciones que varían con el tiempo. Para entender el envejecimiento, hay que descubrir los fracasos que se producen en el tejido cardiovascular y definir sus mecanismos subyacentes, e integrar y traducir estos descubrimientos, entre los que se encuentran las enzimas regeneradoras de la matriz extracelular.

Desde su descubrimiento en los años 60, el conocimiento sobre estas enzimas no ha dejado de crecer. Las metaloproteinasas son las efectoras del daño vascular que se produce cuando se desencadena una situación fisiológica o patológica en respuesta al envejecimiento. Estas moléculas modifican la composición y estructura de la matriz extracelular como respuesta a la liberación a otras moléculas como angiotensina II, endotelina-1, aldosterona, especies reactivas de oxígeno (ERO), factor transformador del crecimiento (TGF- β), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α y IL-1 β). Son activadas a través de distintos mecanismos donde se pueden implicar las propias metaloproteinasas, incluso sus inhibidores específicos, siendo más difícil la modulación de su actividad.

Existen evidencias clínicas de que las metaloproteinasas incrementan su expresión en el envejecimiento, cuando se produce una degradación del sistema vascular con variaciones en la homeostasis MMPs/TIMPs, por lo que pueden ser utilizadas como biomarcadores de riesgo en el diagnóstico, prevención y control de patologías vasculares. El tratamiento farmacológico que trata de paliar los efectos de dichas enzimas, está orientado hacia la inhibición de la síntesis de las mismas. Conociendo sus mecanismos de activación, regulación e inhibición, se puede intervenir en la reducción de la expresión en situaciones patológicas, para ello es necesario ampliar el conocimiento de todas las vías de señalización implicadas y elaborar una respuesta farmacológica específica. La inhibición de la actividad de las MMPs o la prevención de su regulación positiva podría reducir el engrosamiento de la pared vascular y la reestenosis coronaria, la aterosclerosis, y en general, el envejecimiento cardiovascular.

7. Conclusiones

1. En condiciones fisiológicas la actividad de las MMPs está controlada por los inhibidores endógenos (TIMPs), que interactúan con los zimógenos, inhibiendo de forma selectiva a MMPs.
2. Su activación depende de cascadas de señalización desencadenadas por angiotensina II, aldosterona, endotelina-1, TGF- β , CTGF, EROs y citoquinas inflamatorias (TNF- α y IL-1 β). Desequilibrios en dichas señalizaciones, conducen a la patogénesis cardiovascular.
3. Las metaloproteinasas son enzimas efectoras esenciales en el envejecimiento cardiovascular, ya que promueven la alteración de la matriz extracelular de los vasos, disminuyendo la distensibilidad arterial y la luz vascular. Por este motivo, las MMPs y TIMPs pueden ser consideradas como biomarcadores de riesgo en la prevención de enfermedades cardiovasculares.

8. Bibliografía

1. Pemberthy López C, Jaramillo-Gómez N, Velásquez Mejía CA, Cardona-Vélez J, Contreras-Martínez H, Jaramillo-Restrepo V. Conceptos actuales sobre el envejecimiento y la enfermedad cardiovascular. Rev Colomb Cardiol [Internet]. 2016;23(3):210–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0120563316000048>
2. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, Esteban V, Suzuki Y, Mezzano S, et al. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. Hypertension [Internet]. 2001;38(6):1382–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751722>
3. Border W., Noble NA. Interactions of transforming growth factor-beta and angiotensin II in renal fibrosis. Hypertension. 1998;31:181–8.
4. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. Invest Dermatol. 2002;118(2).
5. Páramo J a., Montero I, Rodríguez J a., Orbe J. Metaloproteasas en aterosclerosis: implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas. Clínica e Investig en Arterioscler. 2005;17(3):133–41.
6. Pulido Olmo H. Mecanismos moleculares asociados al escape de albuminuria en pacientes con supresión crónica del SRAA. 2016;
7. Guo C, Piacentini L. Type I collagen-induced MMP-2 activation coincides with ip-regulation of membrane type 1-matrix metalloproteinase and TIMP-2 in cardiac fibroblast. J Biol Chem. 2003;278:46699–708.
8. Ali MAM, Schulz R. Novel intracellular role of matrix metalloproteinase-2 in cardiac cell injury. 2012;
9. Raffetto JD, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors in Vascular Remodeling and Vascular Disease. Biochem Pharmacol. 2008;75:346–59.
10. Hadler-Olsen E, Fadnes B, Sylte I, Uhlin-Hansen L, Winberg JO. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. FEBS J. 2011;278(1):28–45.
11. Rodríguez Vita J. Implicación de los agentes vasoactivos , Endotelina-1 y Angiotensina II , y de la citoquina profibrótica TGF- β en la génesis de la lesión. 2007;
12. Harvey A, Montezano AC, Lopes RA, Rios F, Touyz RM. Vascular Fibrosis in Aging and Hypertension: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. Can J Cardiol. 2016;32(5):659–68.
13. He F, Zuo L. Redox Roles of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular diseases. Int J Mol Sci. 2015;11:27770–80.
14. Bruunsgaard H, Skinhoj P, Pedersen AN, Schroll M, Pedersen BK. Ageing, tumour necrosis factor- α (TNF- α) and atherosclerosis. Clin Exp Immunol. 200AD;121:255–60.
15. Siwik D, Chang D, Colucci W. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. Circ Res. 2000;86:1259–65.
16. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res [Internet]. 2010;1803(1):55–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.003>
17. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. Circ Res. 2003;92(8):827–39.
18. Rodríguez JA, Orbe J, Páramo JA. Metaloproteasas, remodelado vascular y síndromes aterotrombóticos. Rev Española Cardiol. 2007;60(9).
19. Yabluchanskiy A, Chiao YA, Ma Y, F. Lopez E, Voorhees AP, Toba H, et al. Cardiac aging is initiated by matrix metalloproteinase-9-mediated endothelial dysfunction. Am J Physiol. 2014;306(10):1398–407.
20. P. Welsh P, Whincup P., Papacosta O, Wannamethee S., Lennon L, Thomson A, et al. Serum matrix metalloproteinase-9 and coronary heart disease: a prospective study in middle-aged men. QJM An Int J Med. 2008;101(10):785–91.
21. Hamed GM, Abdel Fattah MF. Clinical Relevance of Matrix Metalloproteinase 9 in Patients With Acute Coronary Syndrome. Clin Appl Thromb. 2015;21(8):705–11.
22. Garvin P, Jonasson L, Nilsson L, Falk M, Kristenson M. Plasma matrix metalloproteinase-9 levels predict first-time coronary heart disease: An 8-year follow-up of a community-based middle aged population. PLoS One. 2015;10(9):1–13.
23. G. Lakatta E. So! What's aging? Is cardiovascular aging a disease? J Mol Cell Cardiol. 2015;33(4):395–401.
24. Sundstrom J, Evans J, Benjamin E, Levy D, Larson M, Sawyer D, et al. Relations of plasma total TIMP-1 levels to cardiovascular risk factors and echocardiographic measures: the Framingham heart study. Eur Hear Jour. 2004;25(1509–1516).
25. Cavusoglu E, Ruwende C, Chopra V, Yanamadala S, Eng C, Clark L, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) is an independent predictor of all-cause mortality, cardiac mortality, myocardial infarction. Am Hear Jour. 2006;151:1101–8.